

TOXOCAROSIS. SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN PEDIÁTRICA Y COMPARACIÓN ENTRE DOS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO (ELISA VS WESTERN BLOT)

*Radman NE, **Santillan GI, *Archelli SM, ***Fonrouge RD,
*Burgos L, *Linzitto OR, *†Guardis Mdel V

- * Cátedra de Parasitología Comparada. Laboratorio de Parasitosis Humanas y Zoonosis Parasitarias.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata
**Departamento de Parasitología. Instituto Nacional de Enf.Infecciosas ANLIS "Carlos G Malbran"
***Cátedra de Higiene, Epidemiología y Salud Pública.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: El diagnóstico de toxocarosis se realiza mediante técnicas serológicas, la mas difundida es el test de ELISA. Distintos autores cuestionaron la existencia de reacciones cruzadas en presencia de otras patologías y su utilidad en toxocarosis ocular en cuanto a diagnóstico y seguimiento. Se ha sugerido la necesidad de utilizar técnicas confirmatorias. El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de toxocarosis en una población pediátrica comparando las técnicas de ELISA y Western Blot. El test de ELISA se realizó con un equipo comercial (Bordier Affinity Products), la técnica de Western Blot con antígeno provisto por el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Carlos G. Malbran". Se realizó un diseño caso-control ($n=102$; 51 casos y 51 controles). Tomando como referencia manifestaciones clínicas neurológicas, oculares y pulmonares para el grupo casos. Se obtuvieron los siguientes resultados: ELISA 56% de positivos para los casos y 27% para los controles. Western blot 59% para los casos y 37% para los controles. (χ^2 -cuad. Mac Nemar)= 1,3333 $p=0,6$. No significativo. La concordancia por índice de Kappa fue de 0,52 (IC 95% , 0,36-0,78) con un acuerdo del 78%. Ambas pruebas no presentaron diferencias significativas en la discriminación de positivos y negativos.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de la infección por larvas de *Toxocara canis* en el hombre (toxocarosis) es incierto y se basa en la presencia de signos y síntomas inespecíficos comunes con otras infecciones (4,12,13). En los casos sospechosos se asigna importancia a factores epidemiológicos como: tenencia de caninos, antecedentes de geofagia, ingestión de carne o vísceras de animales poco cocidas o crudas, ingestión de verduras crudas sin higiene, ocupaciones de riesgo etc. (6,8,17).

En el hombre el diagnóstico se realiza sólo por serología, puesto que la observación directa del parásito se efectúa por técnicas de biopsia, siendo esta una práctica cruenta y de baja sensibilidad (16).

La técnica más difundida es el test de ELISA, elaborado con antígeno excretor-secretor de *Toxocara canis*. El antígeno excretor-secretor no es específico de especie, ya que se observan reactividades cruzadas con otras patologías (1,2,7,15,18).

Existe discrepancia sobre la utilidad de la técnica de ELISA en el síndrome de larva migrans ocular (LMO) (5,9,10,19,20).

De acuerdo a la bibliografía consultada se hace necesario el empleo de una prueba de mayor especificidad para obtener resultados confirmatorios (3,11).

El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de toxocarosis en pacientes pediátricos comparando las técnicas de ELISA y Western Blot (WB).

MATERIALES Y MÉTODOS

A) Técnica de ELISA: se utilizó un kit comercial (Bordier Affinity Products, 1013 Crissier, Lausanne, Switzerland) respetando las indicaciones del equipo.

Sobre placas sensibilizadas con antígeno excretor-secretor se detectó la presencia de anticuerpos específicos del parásito en el suero del paciente con una anti IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina.

Interpretación: Muestras con absorbancia menor que el control positivo débil se consideró negativa y muestras con absorbancia mayor al positivo débil se consideraron positivas.

B) Técnica de WB se realizó con antígeno excretor-secretor provisto por el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Carlos G. Malbrán".

La electroforesis en gel de poliacrilamida del antígeno ES/L₂ se realizó en una Mini Protean II (BIORAD) usando un gel de empaquetamiento de 4% y un gel de corrida de 10%, las muestras se eluyeron en buffer disociante, la electroforesis se realizó a 60 MA durante aproximadamente 1 hora. El peso molecular se calculó usando patrones preteñidos Biorad (161-0309).

La transferencia a membranas de nitrocelulosa del ES/L₂ se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin (21) empleando un equipo Mini Trans Blot Cell

(BIORAD), durante 1 hora a 250 MA. Las membranas se bloquearon con buffer PBS/ leche (PBS PH 7,4 / 0,5% de Tween 20, leche descremada 5%) durante 1 hora, luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos con buffer P/T/L (PBS PH 7,2 / 0,5% Tween 20). Se guardaron en el freezer a -20 °C hasta el momento de usar.

Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con el suero de los pacientes y sueros controles diluidos 1/100 en el buffer P/T/L y se incubaron 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron como antes. Se incubaron con anti IgG humana (Sigma A: 8667) 1 hora a temperatura ambiente, con agitación permanente. La reacción se reveló con diaminobencidina.

Interpretación: Se considera positivo cuando se observan Bandas de 120, 70, 55, 30, 32 kDa o y/o bandas de 70 y 55 kDa.

Población estudiada: en un diseño caso-control, realizamos un muestreo de niños de hasta 12 años de edad procedentes de la ciudad de La Plata y alrededores. Para calcular el tamaño de la muestra nos basamos en estudios previos que arrojaron una positividad de 39% (17). Con una proporción de exposición en no enfermos del 13% (6), para un 95% de confianza y 80% de potencia, el valor final de muestras a procesar fue (n=102; 51 casos y 51 controles).

El grupo "casos" estuvo integrado por 64 pacientes con manifestaciones clínicas neurológicas, oculares y pulmonares. El grupo "control" estuvo formado por 48 niños del mismo estrato etario sin las manifestaciones clínicas tomadas como referencia.

Las diferencias entre la cantidad de muestras previstas en el diseño y las obtenidas están dentro del error por muestreo.

Para ambos grupos se completaron encuestas epidemiológicas y clínicas, las muestras se tomaron con consentimiento de los padres de los pacientes.

Para el diseño y cálculos usamos EpiInfo 6.0 y Epidat 3.0.

RESULTADOS

Por test de ELISA se obtuvo una proporción de positivos del 27% para los controles y del 56% para los casos. Para WB los valores fueron: 37% y 59% respectivamente. Realizada la comparación entre las dos técnicas de diagnóstico utilizadas (Western Blot y ELISA), una vez aplicada la prueba de chi cuadrado, variante de McNemar, se obtuvieron los siguientes resultados: (chi-cuad. Mac Nemar) = 1,3333 p=0,6. No significativo.

La Concordancia por índice Kappa fue de 0,52 (IC 95%, 0,36-0,78) con un acuerdo observado del 78%.

Las técnicas comparadas no presentan diferencias significativas en la discriminación de positivos y negativos.

DISCUSIÓN

La complejidad en la biología de *Toxocara ca-*

Tabla 1. Comparación entre el test de ELISA y Western blot en toxocarosis

	ELISA			%(+)	WB			%(+)
	(+)	(-)	Total		(+)	(-)	Total	
Caso	36	28	64	0,5625	38	26	64	0,59375
Control	13	35	48	0,27083	18	30	48	0,375
	49	63	112	0,4375	56	56	112	0,5

nis, su alta frecuencia de presentación en caninos, la prolongada sobrevivencia de sus huevos en el medio ambiente, la diversidad de síntomas en el hombre y la presencia de antígenos compartidos con otros helmintos, hacen necesaria la aplicación de técnicas diagnósticas sensibles y específicas.

El test de ELISA elaborado con antígeno excretor-secretor del nematodo es la técnica mas difundida dependiendo de la calidad del antígeno su sensibilidad y especificidad. Fue utilizada para estudios de seroprevalencia por diversos investigadores, entre otros, Montalvo y col en 1994, Gueglio y col en 1994, Malla y col en 2001, García-Pedrique y col en 2004. Todos ellos señalaron altos índices de positividad.

Por otro lado Malla y col evaluaron diferentes equipos de ELISA para el diagnóstico de esta parasitosis y hallaron correspondencia de resultados.

Magnaval y col en 1984 observaron correlación en los resultados obtenidos entre la técnica de ELISA y la de Western blot.

La reactividad cruzada del antígeno excretor-secretor con *Ascaris* fue observada por Lynch y col en 1988 quienes obtuvieron una disminución del 21,4% en sueros positivos a *T. canis* cuando fueron adsorvidos previamente con extractos de *Ascaris*. También Nunes y col en 1996 indicaron reacciones cruzadas entre *T. canis* y *Ascaris summ* en el diagnóstico de LMV por la técnica de Wb. En nuestro trabajo no se realizó adsorción previa de los sueros con extractos de otros helmintos. Sharkey y col en 1993 hallaron toxocariasis ocular en un paciente con repetidos diagnósticos negativos mediante la técnica de ELISA, Krukar-Baster y col en 1996 indicaron resultados de este test, positivos en una primera etapa de infección por LMO y negativos en los mismos pacientes en etapas posteriores, señalando a esta técnica como un método sensible para indicar la intensidad de la inflamación en la toxocariasis ocular. Humbert y col en 1995 informaron acerca de la utilidad del test de para el diagnóstico y seguimiento de este síndrome pero mencionaron la mayor especificidad del Wb y la necesidad de utilizarlo como confirmatorio.

Schneider y col en 2000 reportaron un caso de LMO con inmunodiagnóstico negativo por ELISA en suero y positivo en humor acuoso. Dietrich y col en 1998 informaron dos casos de LMO positivos mediante ambas técnicas diagnósticas. En nuestro estudio sólo un paciente presentó síntomas oculares, por lo cual estuvo incluido en el grupo casos y en él se halló positividad por ambas técnicas

Degouy y col en 2004 sugirieron la necesidad de realizar el diagnóstico por la técnica de ELISA y la confirmación por el método de Wb. Morales y col en 2002 realizaron estudios comparativos entre ambas técnicas sobre sueros de conejos inoculados, observando total identidad

En la presente investigación también verificamos identidad diagnóstica entre ELISA y WB.

BIBLIOGRAFÍA

1. Badley J, Grieve R, Bowman D, Glikman L, Rocky J. 1987. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory -secretory antigens: Physicochemical characterization and antibody recognition. J. Parasite. 73(3) 593-600
2. Bowman DD, Mika -Grieve M, Grieve RB. 1987. *Toxocara canis*: Monoclonal antibodies to larval excretory - secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. Exp. Parasitol. 64:458 -465)
3. Courtade H, Recco P, Magnaval JF, Charlet JP, Seguela JP. 1995. Etude comparative de deux test ELISA *Toxocara* vis a vis du Western -blot. Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie 13,38-53.
4. Degouy A, Menat C, Aubin F, Piarroux R, Woronoff-Lemsi MC, Humbert P. Toxocariasis. Invest. Clin 2004 45(4):347-54
5. Dietrich A, Auer H, Tittl M, Barisani-Asenbauer T. Ocular toxocariasis in Austria Dtsch Med Wochenschr. 1998 May 15;123(20):626-30.
6. Fonrouge R, Guardis M, Radman N, Archelli S. "Contaminación de suelos con huevos de *Toxocara sp.* en plazas y parques públicos de la ciudad de La Plata. Buenos Aires, Argentina. Bol. chil. parasitol, vol.55 (3-4)
7. Garcia-Pedrique ME, Diaz-Suarez O, Estevez J, Cheng-Ng R, Araujo-Fernandez M, Castellano J, Araujo J, Cabrera L. Prevalence of infection by *Toxocara* in schoolchildren in the community of El Mojan, Zulia state, Venezuela. Trop Med Int Health. 2004 Dec;9(12):1312-8
8. Gueglio B, Gentile L, Nguyen J M, Achard J, Chabasse D, Marjolet M 1994. Epidemiologic approach to human toxocariasis in western France. Parasitol. Res. 80: 531-536
9. Humbert P, Buchet S, Barde T.: Toxocariasis. A cosmopolitan parasitic zoonosis. J Clinical Microbiol 1992 30(9):2269-74.
10. Krukar-Baster K, Zygulska-Mach H, Sajak-Hydzyk K, Kubicka-Trzaska A, Dymon M.: Klin Oczna. 1996;98(6):445-8.
11. Magnaval IF, Fabre R, Maurieres JP, Charlet IP, Larrad de B. 1991. Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol Res. 77:697-702.

12. Malla N, Aggarwal AK, Majan RC : A serological study of human toxocariasis in north India. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2001 Sept 108 (9):390-2.
13. Montalvo AM, Espino AM, Escalante G, Finlay CM. Study of the seroprevalence of toxocariasis in an infantile population in the City of Havana . Rev Cubana Med Trop 1994. 46(3):156-8.
14. Morales OL, Lopez MC, Nicholls RS, Agudelo C.: Identification of *Toxocara canis* antigens by Western blot in experimentally infected rabbits. Rev Inst.Med Trop.Sao Paulo 2002 44(4):213-6.
15. Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ.: Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. Ann Dermatol Veneol. 1996.123(4):240-6
16. Page AP, Richards DT, Lewis JW, Omar HM, Maizels RM.: Comparison of isolates and species of *Toxocara y Toxascaris* by biosynthetic labelling of somatic and ES proteins from infective larvae. Parasitology 1991 103, 451-464
17. Radman NE, Archelli SM, Fonrouge R, Guardis M del V, Linzitto OR. 2000. Human Toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata Mem Inst Oswaldo Cruz Vol.95(3):281-285
18. Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sanchez-Andrade R, Lopez C, Suarez JL, Diaz P, Diez-Banos P, Morrondo P, Paz-Silva A.: Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepática*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum*
19. Schneider C, Arnaud B, Schmitt-Bernard CF.: Ocular toxocariasis. Value of local inmunodiagnosis. J FR Ophtalmol 2000.23(10).1016-9
20. Sharkey JA, McKay PS. Br J Ophthalmol.: Ocular toxocariasis in a patient with repeatedly negative ELISA titre to *Toxocara canis*. Ophthalmol. 1993 Apr;77(4):253-4.
21. Towbin H, Stachlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA. 1979. 72: 4350-4354.